



PCT

特許協力条約に基づいて公開された国際出願

<p>(51) 国際特許分類6 C07K 7/06, A61K 38/08, C12N 15/12, C07K 16/18, C12N 5/10, A61K 35/14 // C12P 21/02</p>	<p>A1</p>	<p>(11) 国際公開番号 WO00/06595</p> <p>(43) 国際公開日 2000年2月10日(10.02.00)</p>
<p>(21) 国際出願番号 PCT/JP99/04010</p> <p>(22) 国際出願日 1999年7月27日(27.07.99)</p> <p>(30) 優先権データ 特願平10/212940 1998年7月28日(28.07.98) JP</p> <p>(71) 出願人 ; および (72) 発明者 伊東恭悟(ITOHI, Kyogo)[JP/JP] 〒841-0205 佐賀県三養基郡基山町けやき台2-25-9 Saga, (JP)</p> <p>(71) 出願人 (米国を除くすべての指定国について) 住友製薬株式会社(SUMITOMO PHARMACEUTICALS COMPANY, LIMITED)[JP/JP] 〒541-8510 大阪府大阪市中央区道修町2丁目2番8号 Osaka, (JP)</p> <p>(72) 発明者 ; および (75) 発明者 / 出願人 (米国についてのみ) 小林照忠(KOBAYASHI, Terutada)[JP/JP] 〒830-0001 福岡県久留米市小森野町896 メソンドール小森野B棟103 Fukuoka, (JP)</p>		<p>(74) 代理人 青山 稔, 外(AOYAMA, Tamotsu et al.) 〒540-0001 大阪府大阪市中央区城見1丁目3番7号 IMPビル 青山特許事務所 Osaka, (JP)</p> <p>(81) 指定国 AE, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, CA, CH, CN, CU, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MD, MG, MK, MN, MW, MX, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW, 欧州特許 (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), OAPI特許 (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG), ARIPO特許 (GH, GM, KE, LS, MW, SD, SL, SZ, UG, ZW), ユーラシア特許 (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM)</p> <p>添付公開書類 国際調査報告書 明細書とは別に規則13の2に基づいて提出された生物材料 の寄託に関する表示。</p>
<p>(54) Title: HLA-A2 RESTRAINT TUMOR ANTIGEN PEPTIDE ORIGINATING IN SART-1</p> <p>(54) 発明の名称 SART-1由来のHLA-A2拘束性腫瘍抗原ペプチド</p> <p>(57) Abstract An HLA-A2 restraint tumor antigen peptide originating in SART-1 and its derivative having functional characteristics comparable thereto; remedies, preventives or diagnostics for tumor with the use of the tumor antigen peptide, etc.; recombinant DNAs, recombinant peptides and antibodies relating to the tumor antigen peptide and use of the same; antigen presenting cells presenting the tumor antigen peptide and use of the same; and cytotoxic T cells specific to the tumor antigen peptide and use of the same.</p>		

(57)要約

SART-1由来のHLA-A2拘束性腫瘍抗原ペプチド及び機能的に同等の特性を有するその誘導体、又は該腫瘍抗原ペプチド等を利用した腫瘍の治療剤、予防剤または診断薬、該腫瘍抗原ペプチドに関連する組換えDNA、組換えポリペプチド、抗体およびその利用、該腫瘍抗原ペプチドを提示している抗原提示細胞およびその利用、該腫瘍抗原ペプチドに特異的な細胞傷害性T細胞およびその利用。

PCTに基づいて公開される国際出願のパンフレット第一頁に掲載されたPCT加盟国を同定するために使用されるコード(参考情報)

AE	アラブ首長国連邦	DM	ドミニカ	KZ	カザフスタン	RU	ロシア
AL	アルバニア	EE	エストニア	LC	セントルシア	SD	スーダン
AM	アルメニア	ES	スペイン	LI	リヒテンシュタイン	SE	スウェーデン
AT	オーストリア	FI	フィンランド	LK	スリ・ランカ	SG	シンガポール
AU	オーストラリア	FR	フランス	LR	リベリア	SI	スロヴェニア
AZ	アゼルバイジャン	GA	ガボン	LS	レソト	SK	スロヴァキア
BA	ボスニア・ヘルツェゴビナ	GB	英国	LT	リトアニア	SL	シエラ・レオネ
BB	バルバドス	GD	グレナダ	LU	ルクセンブルグ	SN	セネガル
BE	ベルギー	GE	グルジア	LV	ラトヴィア	SZ	スワジランド
BF	ブルキナ・ファソ	GH	ガーナ	MA	モロッコ	TD	チャード
BG	ブルガリア	GM	ガンビア	MC	モナコ	TG	トーゴ
BJ	ベナン	GN	ギニア	MD	モルドヴァ	TJ	タジキスタン
BR	ブラジル	GW	ギニア・ビサウ	MG	マダガスカル	TZ	タンザニア
BY	ベラルーシ	GR	ギリシャ	MK	マケドニア旧ユーゴスラヴィア	TM	トルクメニスタン
CA	カナダ	HR	クロアチア		共和国	TR	トルコ
CF	中央アフリカ	HU	ハンガリー	ML	マリ	TT	トリニダード・トバゴ
CG	コンゴ	ID	インドネシア	MN	モンゴル	UA	ウクライナ
CH	スイス	IE	アイルランド	MR	モーリタニア	UG	ウガンダ
CI	コートジボワール	IL	イスラエル	MW	マラウイ	US	米国
CM	カメルーン	IN	インド	MX	メキシコ	UZ	ウズベキスタン
CN	中国	IS	アイスランド	NE	ニジェール	VN	ヴェトナム
CR	コスタ・リカ	IT	イタリア	NL	オランダ	YU	ユーゴスラビア
CU	キューバ	JP	日本	NO	ノールウェー	ZA	南アフリカ共和国
CY	キプロス	KE	ケニア	NZ	ニュージーランド	ZW	ジンバブエ
CZ	チェッコ	KG	キルギスタン				
DE	ドイツ	KP	北朝鮮	PL	ポーランド		
DK	デンマーク	KR	韓国	PT	ポルトガル		
				RO	ルーマニア		

明 細 書

SART-1由来のHLA-A2拘束性腫瘍抗原ペプチド

5 技術分野

本発明は、SART-1由来のHLA-A2拘束性腫瘍抗原ペプチドに関する。
さらに詳しくは、本発明は、SART-1由来のHLA-A2拘束性腫瘍抗原ペ
プチドおよび機能的に同等の特性を有するその誘導体、これらの腫瘍抗原ペプチ
ドおよびその誘導体をイン・ビボもしくはイン・ビトロで利用した腫瘍の治療剤、
10 予防剤、または診断薬などに関する。

背景技術

生体による腫瘍の排除には、免疫系、特にT細胞が重要な役割を果たしている
ことが知られている。実際、ヒトの腫瘍局所には腫瘍細胞に対して傷害活性を示
すリンパ球の浸潤が認められ (Arch. Surg., 126:200, 1990)、メラノーマから
15 は自己の腫瘍細胞を認識する細胞傷害性T細胞 (CTL) が比較的容易に分離さ
れている (Immunol. Today, 8:385, 1987、J. Immunol., 138:989, 1987、
Int. J. Cancer, 52:52, 1992等)。また、該CTLの移入によるメラノーマ治療
の臨床結果からも、腫瘍排除におけるT細胞の重要性が示唆されている (J. Natl.
20 Cancer. Inst., 86:1159, 1994)。

自己の腫瘍細胞を攻撃するCTLが標的とする分子については長い間不明であ
ったが、最近の免疫学および分子生物学の進歩により次第に明らかになってきた。
すなわちCTLは、T細胞受容体 (TCR) を用いて、腫瘍抗原ペプチドと呼ば
れるペプチドと主要組織適合遺伝子複合体クラスI抗原 (MHCクラスI抗原、
25 ヒトの場合はHLA抗原と呼ばれる) との複合体を認識することにより、自己の
腫瘍細胞を攻撃していることが明らかとなった。

腫瘍抗原ペプチドは、腫瘍に特有のタンパク質、すなわち腫瘍抗原タンパク質
が細胞内で合成された後、プロテアソームにより細胞内で分解されることによっ
て生成される。生成された腫瘍抗原ペプチドは、小胞体内でMHCクラスI抗原

(H L A抗原) と結合して複合体を形成し、細胞表面に運ばれて抗原提示される。この抗原提示された複合体を腫瘍特異的なC T Lが認識し、細胞傷害作用やリン
フオカインの産生を介して抗腫瘍効果を示す。このような一連の作用の解明に伴
い、腫瘍抗原タンパク質または腫瘍抗原ペプチドをいわゆる癌ワクチンとして利
5 用することにより、腫瘍患者の体内の腫瘍特異的C T Lを増強させる治療法が可
能となった。

腫瘍抗原タンパク質としては、1991年にT. Boonらが初めてM A G E と名付け
たタンパク質をヒトメラノーマ細胞から同定した (Science , 254:1643, 1991) 。
その後、いくつかの腫瘍抗原タンパク質が、主にメラノーマ細胞から同定されて
10 いる。メラノーマ抗原としては、メラノサイト組織特異的タンパク質である g p
1 0 0 (J. Exp. Med. , 179:1005, 1994) 、M A R T - 1 (Proc. Natl. Acad.
Sci. USA, 91:3515 , 1994) 、チロシナーゼ (J. Exp. Med. , 178:489 , 1993) な
どのメラノソームタンパク質、メラノーマだけでなく各種癌細胞と正常精巣細胞
に発現するMAGE関連タンパク質群 (J. Exp. Med. , 179:921 , 1994) 、腫瘍特異的
15 なアミノ酸変異を持つ β -カテニン (J. Exp. Med. , 183:1185, 1996) 、C D K 4
(Science , 269 : 1281, 1995) などが同定されている。また、メラノーマ以外
の腫瘍抗原タンパク質としては、H E R 2 / n e u (J. Exp. Med. , 181:2109,
1995) 、p 5 3 (変異型) (Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 93:14704, 1996) な
どの癌遺伝子産物、C E A (J. Natl. Cancer. Inst. , 87:982, 1995) 、P S A
20 (J. Natl. Cancer. Inst. , 89:293, 1997) などの腫瘍マーカー、H P V (J.
Immunol. , 154:5934, 1995) 、E B V (Int. Immunol. , 7:653 , 1995) などのウ
イルスタンパク質などが同定されている。これらについては、総説 (Immunol.
Today , 18:267, 1997、J. Exp. Med. , 183:725 , 1996、Curr. Opin. Immunol. , 8:
628, 1996等) の記述に詳しい。

25 腫瘍抗原タンパク質や腫瘍抗原ペプチドを腫瘍の治療や診断に応用するため
には、メラノーマに比べて発生頻度が圧倒的に高い扁平上皮癌 (食道癌、肺癌等)
等に幅広く適応可能な腫瘍抗原の同定が重要である。これに関して、本発明者ら
は食道癌由来の扁平上皮癌細胞から腫瘍抗原タンパク質をコードする遺伝子のク
ローニングを行った結果、メラノーマ以外の腫瘍細胞から初めて、新規な腫瘍抗

原タンパク質（SART-1）をコードする遺伝子のクローニングに成功し、該 SART-1 より、HLA-A26 抗原またはHLA-A24 抗原に結合して提示されるいくつかの腫瘍抗原ペプチド部分を同定した（J. Exp. Med., 187:277, 1998、国際公開第97/46676号パンフレット）。

- 5 しかしながら、該 SART-1 が、HLA-A2 抗原に結合して提示される腫瘍抗原ペプチド部分を有しているか否か、すなわち SART-1 由来のHLA-A2 拘束性腫瘍抗原ペプチドが存在しているか否かについては、明らかにされていない。

10 発明の開示

- 本発明は、SART-1 由来のHLA-A2 拘束性腫瘍抗原ペプチドを提供することを目的とする。すなわち本発明は、SART-1 由来のHLA-A2 拘束性腫瘍抗原ペプチドおよび機能的に同等の特性を有するその誘導体、またはこれらの腫瘍抗原ペプチドおよびその誘導体をイン・ビボまたはイン・ビトロで利用
15 した腫瘍の治療剤、予防剤または診断薬などを提供することを目的とする。本発明のSART-1 由来のHLA-A2 拘束性腫瘍抗原ペプチドは、日本人あるいは白人の約40%が保有しているHLA抗原であるHLA-A2に結合して提示される腫瘍抗原ペプチドであることから、多くの患者に適用可能であり、さらに、ヒトの癌でもっとも多く認められる扁平上皮癌等に応用できるものであるため、
20 新規な抗腫瘍剤としての有用性が期待される。ちなみに扁平上皮癌のうち食道癌や肺癌での扁平上皮癌は、現在の化学療法や放射線療法に比較的抵抗性を示すことが知られている。その点からも、本発明の腫瘍抗原ペプチドの開発が期待される。

- 本発明者らは、SART-1 分子中に、HLA-A2 拘束性の腫瘍抗原ペプチドが存在しているか否かを調べるために、以下の試みを行った。
25

 まず本発明者らは、組織型が扁平上皮癌に分類される食道癌の手術検体の腫瘍内浸潤リンパ球（TIL）よりHLA-A2拘束性のCTL株を樹立し、これをYK-EC（受託番号：FERM BP-6726）と命名した。続いて、SART-1 cDNAの組換えプラスミドとHLA-A0201 cDNAの組換えプラスミドをVA-13細胞にダブルトランスフェクトし、

そのトランスフェクタントに先のYK-ECを作用させたところ、YK-ECが活性化されてIFN- γ を産生することが見出された。この結果により、SART-1にはHLA-A2拘束性の腫瘍抗原ペプチドが存在していることが初めて明らかになった。

5 本発明者らはさらに、HLA-A2に結合して提示されるSART-1由来の部分ペプチドの同定を試み、配列番号：1～配列番号：6に記載のアミノ酸配列で示されるペプチド等に腫瘍抗原ペプチドとしての活性が存することを明らかにした。

本発明は、以上のような知見に基づき完成するに至ったものである。

すなわち本発明は、

10 (1) SART-1由来の部分ペプチドであって、かつHLA-A2抗原と結合して細胞傷害性T細胞により認識され得る腫瘍抗原ペプチド、または機能的に同等の特性を有するその誘導体；

(2) 配列番号：1～配列番号：34のいずれかに記載のアミノ酸配列の全部または一部を含む配列より選択される、前記(1)記載の腫瘍抗原ペプチド、または機能的に同等の特性を有するその誘導体；

15 (3) 配列番号：1～配列番号：6のいずれかに記載のアミノ酸配列の全部または一部を含む配列より選択される、前記(2)記載の腫瘍抗原ペプチド、または機能的に同等の特性を有するその誘導体；

20 (4) 配列番号：1～配列番号：34のいずれかに記載のアミノ酸配列の第2位および／またはC末端のアミノ酸残基が他のアミノ酸残基に置換されたアミノ酸配列の全部または一部を含む配列より選択される、前記(2)記載の腫瘍抗原ペプチド誘導体；

25 (5) 配列番号：1～配列番号：6のいずれかに記載のアミノ酸配列の第2位および／またはC末端のアミノ酸残基が他のアミノ酸残基に置換されたアミノ酸配列の全部または一部を含む配列より選択される、前記(4)記載の腫瘍抗原ペプチド誘導体；

(6) 配列番号：1～配列番号：34のいずれかに記載のアミノ酸配列の第2位がロイシン、メチオニン、バリン、イソロイシンまたはグルタミンに置換され、および／またはC末端のアミノ酸残基がバリンまたはロイシンに置換されたアミノ酸配列の全部または一部を含む配列より選択される、前記(4)記載の腫瘍抗

原ペプチド誘導体；

(7) 配列番号：35～配列番号：40のいずれかに記載のアミノ酸配列の全部または一部を含む配列より選択される、前記(6)記載の腫瘍抗原ペプチド誘導体；

5 (8) 前記(1)～(7)のいずれかに記載の腫瘍抗原ペプチドおよびその誘導体から選択される少なくとも1種を有効成分として含有してなる、腫瘍の治療剤または予防剤；

(9) 前記(1)～(7)のいずれかに記載の腫瘍抗原ペプチドまたはその誘導体をコードするDNAの少なくとも1種を含有する組換えDNA；

10 (10) 前記(9)記載の組換えDNAを発現させて得られうるポリペプチド；

(11) 前記(9)記載の組換えDNAまたは前記(10)記載のポリペプチドを有効成分として含有してなる、腫瘍の治療剤または予防剤；

15 (12) 前記(1)～(7)のいずれかに記載の腫瘍抗原ペプチドもしくはその誘導体または前記(10)記載のポリペプチドを含有してなる腫瘍の診断薬；

(13) 前記(1)～(7)のいずれかに記載の腫瘍抗原ペプチドまたはその誘導体に特異的に結合する抗体；

20 (14) 腫瘍患者由来の単離された抗原提示能を有する細胞の表面に、HLA-A2抗原と前記(1)～(7)のいずれかに記載の腫瘍抗原ペプチドまたはその誘導体との複合体を提示させてなる抗原提示細胞；

(15) 前記(9)記載の組換えDNAまたは前記(10)記載のポリペプチドを、腫瘍患者由来の単離された抗原提示能を有する細胞に取り込ませて得られうる、前記(14)記載の抗原提示細胞；

25 (16) 前記(14)または(15)記載の抗原提示細胞を有効成分として含有してなる腫瘍の治療剤；

(17) HLA-A2抗原と前記(1)～(7)のいずれかに記載の腫瘍抗原ペプチドまたはその誘導体との複合体を特異的に認識する細胞傷害性T細胞；

(18) 前記(17)記載の細胞傷害性T細胞を有効成分として含有してなる腫瘍の治療剤；

(19) 受託番号がFERM BP-6726である、上記(17)記載の細胞傷害性T細胞YK-EC；ならびに

(20) 前記(19)記載のYK-ECを用いることを特徴とする、腫瘍抗原タンパク質または腫瘍抗原ペプチドの同定方法

5 を提供するものである。

発明を実施するための最良の形態

本明細書中、本発明に関して「腫瘍抗原ペプチド」とは、腫瘍抗原タンパク質 SART-1 (J. Exp. Med., 187:277, 1998、国際公開第97/46676号パンフレット) 由来の部分ペプチドであって、かつHLA-A2抗原と結合して細胞傷害性 T細胞(CTL)により認識され得る腫瘍抗原ペプチドを指す。すなわち、国際公開第97/46676号パンフレットの配列番号: 1に記載のSART-1のアミノ酸配列の一部よりなるペプチドであって、かつ、該ペプチドとHLA-A2抗原との結合複合体がCTLにより認識され得るようなペプチドであれば、当該SART-1のアミノ酸配列中の如何なる位置に存する如何なる長さのペプチドであつても、全て、本発明の腫瘍抗原ペプチドの範疇に含まれる。このような本発明の腫瘍抗原ペプチドは、SART-1の一部よりなる候補ペプチドを合成し、該ペプチドとHLA-A2抗原との複合体がCTLにより認識されるか否か、すなわち候補ペプチドが腫瘍抗原ペプチドとしての活性を有するか否かを本明細書に記載の方法又は当業者が利用可能な方法でアッセイすることにより、同定することができる。

ここで、ペプチドの合成については、通常のペプチド化学において用いられる方法に準じて行うことができる。該公知方法としては、文献(ペプタイド・シンセシス(Peptide Synthesis), Interscience, New York, 1966; ザ・プロテインズ(The Proteins), Vol 2, Academic Press Inc., New York, 1976; ペプチド合成, 丸善(株), 1975; ペプチド合成の基礎と実験, 丸善(株), 1985; 医薬品の開発 続 第14巻・ペプチド合成, 広川書店, 1991)などに記載されている方法が挙げられる。

本発明において、「HLA-A2抗原と結合してCTLにより認識され得る」

とは、本発明の腫瘍抗原ペプチドがHLA-A2抗原と結合して複合体を形成し、かかる複合体をCTLが認識できることをいう。

前記候補ペプチドがHLA-A2抗原と結合してCTLにより認識され得るか否か、すなわち該ペプチドがHLA-A2拘束性の腫瘍抗原ペプチドとしての活性を有しているか否かは、例えば、J. Immunol., 154, p2257, 1995に記載の測定方法により調べることができる。具体的には、HLA-A2抗原陽性のヒトから末梢血リンパ球を単離し、イン・ビトロでペプチドを添加して刺激した場合に、該候補ペプチドをパルスしたHLA-A2陽性細胞を特異的に認識するCTLが誘導されるか否かにより測定することができる。ここでCTLの誘導の有無は、例えば、抗原ペプチド提示細胞に反応してCTLが産生する種々のサイトカイン（例えばIFN- γ ）の量を酵素免疫測定法（ELISA）等により測定することによって調べることができる。その際の抗原ペプチド提示細胞（標的細胞）としては、例えば、HLA-A2陽性であるが内因性ペプチド提示能が欠損しているT2細胞（Immunogenetics, 21:235, 1985）、あるいはHLA-A2 cDNA（Genbank Accession No. M84379）発現プラスミドをCOS-7細胞（ATCC No. CRL1651）やVA-13細胞（理化学研究所細胞銀行）に導入した細胞などに対して前記ペプチドをパルスした細胞が挙げられる。また、 ^{51}Cr で標識した抗原ペプチド提示細胞に対するCTLの傷害性を測定する方法（ ^{51}Cr リリースアッセイ、Int. J. Cancer, 58:p317, 1994）によっても調べることができる。

あるいは、HLA-A2陽性であるが内因性ペプチド提示能が欠損しているT2細胞（Immunogenetics, 21:235, 1985）、あるいはHLA-A2 cDNA（Genbank Accession No. M84379）発現プラスミドをCOS-7細胞（ATCC No. CRL1651）やVA-13細胞（理化学研究所細胞銀行）に導入した細胞に対して前記候補ペプチドをパルスし、この細胞に対して、本発明において樹立されたHLA-A2拘束性のCTL株であるYK-EC（受託番号：FERM BP-6726）や前記で調製したCTLなどを反応させ、これらのCTLが産生する種々のサイトカイン（例えばIFN- γ ）の量を測定することによっても、調べることができる（J. Exp. Med., 187:277, 1998）。

以上のような測定法を、以下「腫瘍抗原ペプチドの測定法」と称することもある。

HLA抗原に結合して提示される抗原ペプチドの配列にはある規則性（モチーフ）が存在するが、HLA-A2に関しては以下の表1に示したモチーフが知られている（Immunogenetics, 41:178, 1995、J. Immunol., 155:4749-4756, 1995）。

5 表 1 HLA-A2拘束性抗原ペプチドのモチーフ

	HLA-A2のタイプ	N末端から2番目のアミノ酸	C末端のアミノ酸
	HLA-A0201	L, M	V, L
	HLA-A0204	L	L
	HLA-A0205	V, L, I, M	L
10	HLA-A0206	V, Q	V, L
	HLA-A0207	L	L

（ペプチドの長さは8～11アミノ酸）

従って、SART-1のアミノ酸配列上、このようなモチーフ構造を有するペプチド部分
15 部分を前記ペプチド合成法に基き合成し、該ペプチドを前記腫瘍抗原ペプチドの測定法に供することにより、本発明のHLA-A2拘束性腫瘍抗原ペプチドを選択することができる。

すなわち本発明の腫瘍抗原ペプチドとして、SART-1のアミノ酸配列上、前記のようなモチーフ構造に関わるペプチドであって、かつHLA-A2抗原と結合
20 してCTLにより認識され得るような腫瘍抗原ペプチドが例示される。具体的には、配列番号：1～配列番号：34のいずれかに記載のアミノ酸配列の全部または一部を含み、かつHLA-A2抗原と結合してCTLにより認識され得る腫瘍抗原ペプチドが挙げられる。ペプチドの長さとしては、HLA-A2抗原に結合して提示されるという観点から、8～11アミノ酸程度が考えられる。

25 ここで、配列番号：1～配列番号：34のいずれかに記載のアミノ酸配列において、その配列の「全部または一部を含み、かつHLA-A2抗原と結合してCTLにより認識され得るような腫瘍抗原ペプチド」とは、以下のものを指す。

1) 配列番号：1～配列番号：34のいずれかに記載のアミノ酸配列よりなるペプチドまたは配列番号：1～配列番号：34のいずれかに記載のアミノ酸配列の

連続した一部分よりなるペプチド；または

2) 上記1) に記載したペプチドを含むペプチド

であって、かつHLA-A2抗原と結合してCTLにより認識され得るようなペプチドを指す。

- 5 ここで、前記1) および2) のペプチドの長さとしては、8～11アミノ酸程度のものが挙げられる。また、前記2) のペプチドの例として、配列番号：1～配列番号：34のいずれかに記載のアミノ酸配列の全長を含み、該アミノ酸配列よりN末端方向及び／又はC末端方向に長いペプチド、配列番号：1～配列番号：34のいずれかに記載のアミノ酸配列のC末端またはN末端側のアミノ酸が
10 欠失して得られるアミノ酸配列のN末端及び／又はC末端に他のアミノ酸が付加してなるペプチドであって、かつHLA-A2抗原と結合してCTLにより認識され得るようなペプチドが挙げられる。

- 前記腫瘍抗原ペプチドのうち好適なものとしては、配列番号：1～配列番号：20のいずれかに記載のアミノ酸配列の全部または一部を含み、かつHLA-A2
15 2抗原と結合してCTLにより認識され得るような腫瘍抗原ペプチドが挙げられる。ここで当該アミノ酸配列の「全部または一部を含み、かつHLA-A2抗原と結合してCTLにより認識され得るような腫瘍抗原ペプチド」とは、前記1) および2) のペプチドと同様のペプチドを指す。

- 一例として、配列番号：1～配列番号：6のいずれかに記載のアミノ酸配列の
20 全部または一部を含み、かつHLA-A2抗原と結合してCTLにより認識され得るような腫瘍抗原ペプチドが挙げられる。ここで当該アミノ酸配列の「全部または一部を含み、かつHLA-A2抗原と結合してCTLにより認識され得るような腫瘍抗原ペプチド」とは、前記1) 及び2) のペプチドと同様のペプチドを指す。

- 25 本発明において「腫瘍抗原ペプチドと機能的に同等の特性を有する誘導体」(以下、腫瘍抗原ペプチド誘導体と略す場合がある) とは、本発明の腫瘍抗原ペプチドのアミノ酸配列の1～数個のアミノ酸残基を改変した改変体であって、かつHLA-A2抗原と結合してCTLにより認識され得るという腫瘍抗原ペプチドとしての特性を有するものをいう。すなわち、本発明の腫瘍抗原ペプチドのア

ミノ酸配列に対して1または数個のアミノ酸残基を改変した改変体であって、かつHLA-A2抗原と結合してCTLにより認識され得るという腫瘍抗原ペプチドとしての活性を有するものは全て、本発明の腫瘍抗原ペプチド誘導体の範疇に含まれる。

- 5 ここでアミノ酸残基の「改変」とは、アミノ酸残基の置換、欠失及び／又は付加（ペプチドのN末端、C末端へのアミノ酸の付加も含む）を意味し、好ましくはアミノ酸残基の置換が挙げられる。アミノ酸残基の置換に係る改変の場合、置換されるアミノ酸残基の数および位置は、腫瘍抗原ペプチドとしての活性が維持される限り任意である。本発明の腫瘍抗原ペプチド誘導体の長さとしては、前記
- 10 腫瘍抗原ペプチドと同様に8～11アミノ酸程度が好ましい。

- 先に記載したように、HLA抗原に結合して提示される抗原ペプチドの配列には規則性（モチーフ）があり、HLA-A2抗原の場合、前記表1に示したモチーフが知られている（Immunogenetics, 41:178, 1995、J. Immunol., 155:4749-4756, 1995）。また、該モチーフ上とり得るアミノ酸に類似の性質を持つアミノ
- 15 酸残基も許容される可能性がある。従って、本発明の腫瘍抗原ペプチド誘導体の例として、配列番号：1～配列番号：34（好ましくは配列番号：1～配列番号：20）のいずれかに記載のアミノ酸配列のうち、前記モチーフに照らしてアミノ酸の置換が可能な位置、すなわち第2位および／またはC末端のアミノ酸残基を他のアミノ酸残基に置換したアミノ酸配列の全部または一部を含む腫瘍抗原
- 20 ペプチド誘導体が挙げられる。好ましくは、第2位および／またはC末端のアミノ酸残基を前記モチーフ上置換が可能なアミノ酸残基に置換したもの、すなわち配列番号：1～配列番号：34（好ましくは配列番号：1～配列番号：20）のいずれかに記載のアミノ酸配列の第2位をロイシン、メチオニン、バリン、イソロイシンまたはグルタミンに置換し、および／またはC末端のアミノ酸残基をバ
- 25 リンまたはロイシンに置換したアミノ酸配列の全部または一部を含む腫瘍抗原ペプチド誘導体が挙げられる。ペプチドの長さは、HLA-A2抗原に結合して提示されるという観点から、8～11アミノ酸程度が好ましい。

 一例として、配列番号：1～配列番号：6のいずれかに記載のアミノ酸配列の第2位および／またはC末端のアミノ酸残基を他のアミノ酸残基に置換したアミ

ノ酸配列の全部または一部を含む腫瘍抗原ペプチド誘導体が挙げられ、好ましくは、配列番号：1～配列番号：6のいずれかに記載のアミノ酸配列の第2位をロイシン、メチオニン、バリン、イソロイシンまたはグルタミンに置換し、および／またはC末端をバリンまたはロイシンに置換したアミノ酸配列の全部または一部を含む腫瘍抗原ペプチド誘導体が挙げられる。これらの改変ペプチドの例を、
5 それぞれ、配列番号：35～配列番号：40で示す。

なお、本発明の腫瘍抗原ペプチド誘導体は、本発明の腫瘍抗原ペプチドと同様に、候補となるペプチドを前記ペプチド合成法に基づき合成し、これを前記腫瘍抗原ペプチドの測定法に供することにより、腫瘍抗原ペプチドと機能的に同等の
10 特性を有するか否かを同定することができる。

本発明の腫瘍抗原ペプチドまたはその誘導体は、少なくとも1種または2種以上組み合わせることにより、腫瘍の治療剤または予防剤として使用することができる。すなわち本発明は、腫瘍抗原ペプチドまたはその誘導体を有効成分として含有する腫瘍の治療剤または予防剤を提供するものである。本発明の腫瘍の治療剤または予防剤をHLA-A2陽性かつSART-1陽性の患者に投与すると、
15 抗原提示細胞のHLA-A2抗原に腫瘍抗原ペプチドまたはその誘導体が、そのまま細胞表面のHLA-A2分子と結合するか、または抗原提示細胞内に取り込まれた後、HLA抗原と結合して複合体を形成し、該複合体が抗原提示細胞表面に高密度に提示されることにより、提示されたHLA-A2抗原複合体特異的CTLが
20 増殖して腫瘍細胞を破壊することができ、従って、腫瘍の治療または予防が可能となる。

SART-1は、食道癌、肺癌等の扁平上皮癌等に広範に発現しているので、本発明の腫瘍の治療剤または予防剤は、適用範囲の広いことが有利である。さらに、前記扁平上皮癌は、化学療法や放射線療法に抵抗性を示すことが多いが、本
25 発明の腫瘍の治療剤を併用することにより、治療効果を上げることが可能となる。

本発明の腫瘍の治療剤または予防剤は、細胞性免疫が効果的に成立するようにアジュバントとともに投与したり、粒子状の剤型にして投与することができる。アジュバントとしては、文献 (Clin. Microbiol. Rev., 7:277-289, 1994) に記載のものなどが応用可能である。また、リポソーム製剤、直径数 μm のビーズに結

合させた粒子状の製剤、リピッドを結合させた製剤なども考えられる。投与方法としては、皮内投与、皮下投与、静脈注射などが考えられる。製剤中の本発明の腫瘍抗原ペプチドあるいはその誘導体の投与量は、治療目的の疾患、患者の年齢、体重等により適宜調整することができるが、通常0.0001mg～1000mg、好ましくは
5 0.001mg～100mg、より好ましくは0.01mg～10mgであり、これを数日ないし数月に1回投与するのが好ましい。

さらに、本発明の腫瘍の治療剤または予防剤として、前記のように本発明の腫瘍抗原ペプチドまたはその誘導体を有効成分とする場合の他、以下に述べるように、本発明の腫瘍抗原ペプチドまたはその誘導体をコードするDNAや当該DNA
10 Aの発現産物であるポリペプチドも、本発明の腫瘍の治療剤または予防剤の有効成分とすることができる。

すなわち近年、複数のCTLエピトープを連結させた、いわゆる「ポリトープ」をコードするDNAを、DNAワクチンに利用する手法が用いられている（例えば Journal of Immunology, 160, p1717, 1998などを参照のこと）。従って、
15 本発明の腫瘍抗原ペプチドまたはその誘導体をコードするDNAを少なくとも1種または2種以上連結させることにより、さらには所望により他の腫瘍抗原ペプチドをコードするDNAをも連結させることにより作製された組換えDNAを、適当な発現ベクターに組み込むことにより、腫瘍の治療剤または予防剤の有効成分とすることができる。また、前記の組換えDNAを治療剤または予防剤として
20 用いるのみならず、当該組換えDNAを宿主細胞内で発現させて得られたポリペプチドも、腫瘍の治療剤または予防剤の有効成分とすることができる。

ここで「組換えDNA」は、DNA合成および通常の遺伝子工学的手法に基づき、例えば Molecular Cloning 2nd Edt., Cold Spring Harbor Laboratory Press (1989)等の基本書に従い容易に作製することができる。また、この組換え
25 DNAの発現ベクターへの組み込みも、前記基本書等に従い行うことができる。

作製された本発明の組換えDNAが、HLA-A2抗原と結合してCTLにより認識され得る腫瘍抗原ペプチドを生じるか否かは、例えば以下の方法により測定することができる。

すなわちまず、COS-7細胞（ATCC CRL1651）やVA-13細胞（理化学研究所細胞開

発銀行) といった細胞に対し、候補となる組換えDNAを有する発現プラスミドと、HLA-A2抗原をコードするcDNA (Genbank Accession No. M84379) を有する発現プラスミドとをダブルトランスフェクトする。トランスフェクションは、例えばリポフェクトアミン試薬 (GIBCO BRL社製) を用いたリポフェクチン法などにより行うことができる。その後、HLA-A2に拘束性のCTL (例えばYK-EC、FERM BP-6726) を加えて作用させ、該CTLが反応して産生する種々のサイトカイン (例えばIFN- γ) の量を、例えばELISA法などで測定することによって、候補DNAが活性を有するか否かを調べることができる。

本発明の組換えDNAを腫瘍の治療剤または予防剤として適用する際には、以下の方法が使用され得る。

すなわち、本発明の組換えDNAを細胞内に導入する方法としては、ウイルスベクターによる方法およびその他の方法 (日経サイエンス, 1994年4月号, 20-45頁、月刊薬事, 36(1), 23-48(1994)、実験医学増刊, 12(15), (1994)、およびこれらの引用文献等) のいずれの方法も適用することができる。

ウイルスベクターによる方法としては、例えばレトロウイルス、アデノウイルス、アデノ関連ウイルス、ヘルペスウイルス、ワクシニアウイルス、ポックスウイルス、ポリオウイルス、シンビスウイルス等のDNAウイルス又はRNAウイルスに本発明のDNAを組み込んで導入する方法が挙げられる。この中で、レトロウイルス、アデノウイルス、アデノ関連ウイルス、ワクシニアウイルス等を用いた方法が特に好ましい。

その他の方法としては、発現プラスミドを直接筋肉内に投与方法 (DNAワクチン法)、リポソーム法、リポフェクチン法、マイクロインジェクション法、リン酸カルシウム法、エレクトロポレーション法等が挙げられ、特にDNAワクチン法、リポソーム法が好ましい。

本発明の組換えDNAを実際に医薬として作用させるには、当該DNAを直接体内に導入する *in vivo*法、およびヒトからある種の細胞を採集し体外でDNAを該細胞に導入しその細胞を体内に戻す *ex vivo*法がある (日経サイエンス, 1994年4月号, 20-45頁、月刊薬事, 36(1), 23-48(1994)、実験医学増刊, 12(15), (1994)、およびこれらの引用文献等)。 *in vivo*法がより好ましい。

in vivo法により投与する場合は、治療目的の疾患、症状等に応じた適当な投与経路により投与され得る。例えば、静脈、動脈、皮下、皮内、筋肉内等に投与することができる。 in vivo法により投与する場合は、例えば、液剤等の製剤形態をとりうるが、一般的には有効成分である本発明の組換えDNAを含有する注射剤等とされ、必要に応じて、慣用の担体を加えてもよい。また、本発明の組換えDNAを含有するリポソームまたは膜融合リポソーム（センダイウイルス（H V J）ーリポソーム等）においては、懸濁剤、凍結剤、遠心分離濃縮凍結剤等のリポソーム製剤の形態とすることができる。

製剤中の本発明の組換えDNAの含量は、治療目的の疾患、患者の年齢、体重等により適宜調整することができるが、通常、0.0001mg～100mg、好ましくは0.001mg～10mgの本発明の組換えDNAを、数日ないし数月に1回投与するのが好ましい。

以上のような本発明の組換えDNAの腫瘍患者への投与により、抗原提示細胞内で当該組換えDNAに対応するポリペプチドが高発現する。その後、細胞内分解を受けて生じた個々の腫瘍抗原ペプチドがHLA抗原と結合して複合体を形成し、該複合体が抗原提示細胞表面に高密度に提示され、この複合体特異的なCTLが体内で効率的に増殖し、さらには腫瘍細胞を破壊する。以上のようにして、腫瘍の治療又は予防が達成される。

また、前記組換えDNAを発現させて得られうる「組換えポリペプチド（または単にポリペプチドと称す）」は、前記組換えDNAを適当な発現ベクター（例えばpSV-S P O R T 1など）に組み込んで作製された発現プラスミドを宿主細胞に導入して形質転換体を得、この形質転換体を適当な培地で培養することにより、発現・生産することができる。ここで宿主細胞としては、大腸菌などの原核生物、酵母のような単細胞真核生物、昆虫、動物などの多細胞真核生物の細胞などが挙げられる。また、宿主細胞への遺伝子導入法としては、リン酸カルシウム法、DEAEーデキストラン法、電気パルス法などがある。以上のようにして得られたポリペプチドは、一般的な生化学的方法によって単離精製することができる。また、当該ポリペプチドがHLA-A 2抗原と結合してCTLにより認識され得る腫瘍抗原ペプチドを生じるか否かは、例えばマクロファージなどの食細

胞に本発明のポリペプチドを取り込ませて細胞内でペプチド断片を生じさせ、その後、該ペプチド断片とHLA-A2抗原との複合体に対してYK-EC (FERM BP-6726) などのCTLを加えて作用させ、該CTLが反応して産生する種々のサイトカイン（例えばIFN- γ ）の量を測定することなどによって調べるができる。

- 5 本発明のポリペプチドを腫瘍の治療剤または予防剤として適用する際には、前記本発明の腫瘍抗原ペプチドまたはその誘導体と同様の投与形態、投与方法および投与量により、投与することができる。本発明のポリペプチドを腫瘍患者に投与すると、抗原提示細胞内に取り込まれ、その後、細胞内分解を受けて生じた個々の腫瘍抗原ペプチドがHLA抗原と結合して複合体を形成し、該複合体が抗原提示細胞表面に高密度に提示され、この複合体に特異的なCTLが体内で効率的に増殖し、さらには腫瘍細胞を破壊する。以上のようにして、腫瘍の治療又は予防が達成される。
- 10

- 本発明は、本発明の腫瘍抗原ペプチドまたはその誘導体に特異的に結合する抗体を提供する。該抗体は、例えば、Antibodies; A Laboratory Manual, Lane, H, D.ら編, Cold Spring Harbor Laboratory Press 出版 New York 1989などに記載の方法により容易に作製される。すなわち、本発明の腫瘍抗原ペプチドまたはその誘導体を用いて常法により適宜動物を免疫することにより、腫瘍抗原ペプチドまたはその誘導体を認識する抗体、さらにはその活性を中和する抗体が容易に作製できる。抗体の用途としては、アフィニティークロマトグラフィー、免疫学的診断等が挙げられる。免疫学的診断は、イムノブロット法、放射免疫測定法 (RIA)、酵素免疫測定法 (ELISA)、蛍光あるいは発光測定法等より適宜選択できる。
- 15
- 20

- 本発明の腫瘍抗原ペプチドもしくはその誘導体、または本発明の組換えDNAもしくは該組換えDNAを発現させて得られるポリペプチドは、腫瘍患者の治療において、以下のようにイン・ビトロで利用することが可能である。
- 25

すなわち、腫瘍抗原ペプチドまたはその誘導体等を腫瘍の治療に用いる場合、患者の体内で効率良く特異的なCTLを誘導することの可能な投与方法が重要になる。そのための手段のひとつとして、本発明は、腫瘍患者由来の単離された抗原提示能を有する細胞の表面に、HLA-A2抗原と本発明の腫瘍抗原ペプチドま

たはその誘導体との複合体を提示させた抗原提示細胞、および該抗原提示細胞を有効成分として含有してなる腫瘍の治療剤を提供するものである。

ここで「抗原提示能を有する細胞」とは、本発明の腫瘍抗原ペプチドまたはその誘導体を提示することの可能なHLA-A2抗原を細胞表面に発現する細胞であれば特に限定されないが、特に抗原提示能が高いとされる樹状細胞が好ましい。

また、前記抗原提示能を有する細胞から本発明の抗原提示細胞を調製するために添加される物質としては、本発明の腫瘍抗原ペプチドまたはその誘導体のみならず、本発明の組換えDNAまたはポリペプチドであっても良い。

本発明の抗原提示細胞は、腫瘍患者から抗原提示能を有する細胞を単離し、該細胞に本発明の腫瘍抗原ペプチドまたはその誘導体、あるいは本発明のポリペプチドを体外でパルスしてHLA-A2抗原と前記ペプチドまたはその誘導体との複合体を作製することにより得られる(Cancer Immunol. Immunother., 46:82, 1998, J. Immunol., 158:p1796, 1997, Cancer Res., 59:p1184, 1999)。樹状細胞を用いる場合は、例えば、腫瘍患者の末梢血からフィコール法によりリンパ球を分離し、その後非付着細胞を除き、付着細胞をGM-CSFおよびIL-4存在下で培養して樹状細胞を誘導し、当該樹状細胞を本発明の腫瘍抗原ペプチドまたはポリペプチドと共に培養してパルスすることなどにより、本発明の抗原提示細胞を調製することができる。

また、前記抗原提示能を有する細胞に本発明の組換えDNAを導入することにより本発明の抗原提示細胞を調製する場合は、Cancer Res., 56:p5672, 1996やJ. Immunol., 161: p5607, 1998などを参考にして行うことができる。また、DNAのみならずRNAの形態でも同様に抗原提示細胞を調製することができるが、この場合は、J. Exp. Med., 184: p465, 1996などを参考にして行うことができる。

前記抗原提示細胞を有効成分として含有する腫瘍の治療剤は、抗原提示細胞を安定に維持するために、生理食塩水、リン酸緩衝生理食塩水(PBS)、培地等を含むことが好ましい。投与方法としては、静脈内投与、皮下投与、皮内投与が挙げられる。このような抗原提示細胞を有効成分として含有してなる腫瘍の治療剤を患者の体内に戻すことにより、HLA-A2陽性かつSART-1陽性の患者の体内で効率良く特異的なCTLが誘導され、腫瘍を治療することができる。

さらに、本発明の腫瘍抗原ペプチドまたはその誘導体のイン・ビトロでの利用法として、以下の養子免疫療法における利用が挙げられる。

すなわちメラノーマにおいては、患者本人の腫瘍内浸潤T細胞を体外で大量に培養して、これを患者に戻す養子免疫療法に治療効果が認められている

- 5 (J. Natl. Cancer. Inst., 86:1159, 1994)。またマウスのメラノーマにおいては、脾細胞をイン・ビトロで腫瘍抗原ペプチドTRP-2で刺激し、腫瘍抗原ペプチドに特異的なCTLを増殖させ、該CTLをメラノーマ移植マウスに投与することにより、転移抑制が認められている (J. Exp. Med., 185:453, 1997)。これは、
10 抗原提示細胞のHLA抗原と腫瘍抗原ペプチドとの複合体を特異的に認識するCTLをイン・ビトロで増殖させた結果に基づくものである。従って、本発明の腫瘍抗原ペプチドまたはその誘導体、あるいは本発明の組換えDNAやポリペプチドを用いて、イン・ビトロで患者末梢血リンパ球を刺激して腫瘍特異的CTLを増やした後、このCTLを患者に戻す治療法は有用であると考えられる。

- すなわち本発明は、前記HLA-A2抗原と本発明の腫瘍抗原ペプチドまたは
15 その誘導体との複合体を特異的に認識するCTL、および、該CTLを有効成分として含有してなる腫瘍の治療剤をも提供するものである。該治療剤は、CTLを安定に維持するために、生理食塩水、リン酸緩衝生理食塩水(PBS)、培地等を含むことが好ましい。投与方法としては、静脈内投与、皮下投与、皮内投与が挙げられる。このようなCTLを有効成分として含有してなる腫瘍の治療剤を
20 患者の体内に戻すことにより、HLA-A2陽性かつSART-1陽性の患者の体内でCTLによる腫瘍細胞の傷害作用が促進され、腫瘍細胞を破壊することにより、腫瘍を治療することができる。

- また、本発明の腫瘍抗原ペプチドおよびその誘導体、または本発明のポリペプチドは、腫瘍を診断するための診断薬の成分とすることができる。すなわち、本
25 発明の腫瘍抗原ペプチドまたはその誘導体そのものなどを診断薬として用い、腫瘍が疑われる患者から得た試料(例えば血液、腫瘍組織など)中の抗体の存在を検出することにより、腫瘍の早期発見、再発、転移を診断することが可能である。また本発明の腫瘍抗原ペプチド等を有効成分とする医薬の適応可能な腫瘍患者の選択にも利用できる。具体的には、イムノブロット法、RIA、ELISA、蛍

光または発光測定法などを用いることにより、当該診断を行うことができる。

さらに近年、抗原ペプチドとHLA抗原との複合体を用いて抗原特異的CTLを検出する新しい検出方法が確立された (Science, 274:p94, 1996)。本発明の腫瘍抗原ペプチドまたはその誘導体とHLA-A2抗原との複合体を前記検出方法に供し、腫瘍抗原特異的CTLを検出することにより、腫瘍の早期発見、再発、転移を診断することができる。また本発明の腫瘍抗原ペプチド等を有効成分とする医薬の適応可能な腫瘍患者の選択や、当該医薬による治療効果の判定などにも利用できる。すなわち本発明においては、本発明の腫瘍抗原ペプチドまたはその誘導体を含有する、腫瘍の診断薬をも提供するものである。

具体的には、文献 (Science, 274:p94, 1996) に記載の方法に従って蛍光標識したHLA-A2抗原と腫瘍抗原ペプチドとの複合体の4量体を作製し、これを用いて腫瘍が疑われる患者の末梢血リンパ球中の抗原ペプチド特異的CTLをフローサイトメーターにより定量することにより、前記診断を行うことができる。

本発明はまた、食道癌由来の腫瘍内浸潤リンパ球から樹立されたCTLである、YK-EC (受託番号 FERM BP-6726) をも提供するものである。当該YK-ECは、HLA-A2拘束性のCTL株であることが明らかとなっており、本発明のHLA-A2拘束性腫瘍抗原ペプチドも、当該YK-ECへの反応性を指標として見出された腫瘍抗原ペプチドである。従って、YK-ECを利用することにより、新たな腫瘍抗原タンパク質およびHLA-A2拘束性の腫瘍抗原ペプチドを見出すことができ、そのような方法も本発明の対象である。該方法は、例えば上記「腫瘍抗原ペプチドの測定法」の記載に基づいて実施することができ、具体例は後述の実施例2および4に詳細に記載されている。

以下、実施例により本発明を具体的に説明するが、本発明はこれらの実施例によりなんら限定されるものではない。

実施例1 食道癌由来の腫瘍内浸潤リンパ球 (TIL) からの細胞傷害性T細胞 (CTL) 株の樹立

関ら著, Cell. Immunol. 175:101-110, 1997の記載に従い、組織型が扁平上皮癌に分類される食道癌の手術検体のTILよりHLA-A2拘束性のCTL株を樹立し、これをYK-ECと命名して以下の実験に使用した。YK-ECは、茨城県つくば

市東一丁目1番3号、工業技術院生命工学工業技術研究所に寄託されている（微生物の表示：YK-EC；受領日：平成10年6月19日；受託番号FERM P-16855）（国際寄託への変更日：平成11年5月20日；受託番号：FERM-BP-6726）。

5 実施例2 腫瘍抗原タンパク質SART-1に対するYK-ECの反応性

SW620細胞（ATCC株番号CCL-227）から中尾ら著，Cancer. Res.，55:4248-4252, 1995の記載に従い、HLA-A0201のcDNA（Genbank Accession No.M84379）を発現ベクターpCR3（INVITROGEN社製）に組み込んだ組換えプラスミドを作製した。

次に、J. Exp. Med.，187:277, 1998の記載に従い、リポフェクチン法により、
10 以下のようにVA-13細胞（理化学研究所細胞銀行、Ann. Med. Exp. Biol. Fenn.，44:242, 1966）に対してHLA-A0201 cDNAの組換えプラスミドと腫瘍抗原タンパク質SART-1（国際公開第97/46676号パンフレット）の部分配列をコードするcDNAの組換えプラスミド6DIとをダブルトランスフェクトした。なお、SART-1のcDNA全長（国際公開第97/46676号パンフレットの配列番号：2に記載）を保持する
15 E. coli JM109 (K3)は茨城県つくば市東一丁目1番3号、工業技術院生命工学工業技術研究所に寄託されており（微生物の表示：E. coli JM109 (K3)；受領日：平成9年5月22日；受託番号FERM BP-5951）、前記6DIの代わりに該FERM BP-5951から得られるプラスミドK3を使用することも可能である。

具体的には、VA-13細胞を96穴プレートのウェル当たり 10^4 個加えて10% FCSを含むRPMI1640培地で培養後、リポフェクチン試薬（GIBCO BRL社製）を用い、
20 HLA-A0201cDNAの組換えプラスミド100ngと6DI 100ngとを、計30 μ lの液量でダブルトランスフェクトした。トランスフェクタントは2点ずつ用意した。5時間後、このトランスフェクタントに200 μ lの培養液を加えてさらに72時間培養した後、培養液を除去し、 2×10^4 個のYK-ECを加えて18～24時間培養した。培養液を回収
25 し、IFN- γ 量をELISAで測定した。すなわち、96穴プレートに固相化抗体として抗ヒトIFN- γ マウスモノクローナル抗体を吸着させ、ウシ血清アルブミンで非特異的結合をブロックした後、検体中のIFN- γ を抗体に結合させた。次に検出抗体として抗ヒトIFN- γ ウサギポリクローナル抗体を結合させ、さらにアルカリフォスファターゼ標識した抗ウサギイムノグロブリンヤギ抗体（アマシャム社製）
30 を結合した後、ペルオキシダーゼ発色キットT（住友ベークライト社製）を用いて発色させた後、吸光度（405 nm）を測定した。これをスタンダードのIFN-

γで得られた値と比較することにより定量した。なお対照として、トランスフェクトしない無処理群、組換えプラスミド6DIのみをトランスフェクトした群、HLA-A0201cDNAの組換えプラスミドのみをトランスフェクトした群を設定した。その結果を表2に示す。

5

表 2 YK-ECが産生したIFN-γ量

標的細胞	YK-ECが産生したIFN-γ量(pg/ml)
VA-13	0
VA-13 + HLA-A0201	12.2
10 VA-13 + 6DI	22.1
VA-13 + HLA-A0201 + 6DI	94.1

15

腫瘍抗原タンパク質SART-1の部分配列をコードするcDNAの組換えプラスミド6DIとHLA-A0201cDNAの組換えプラスミドをダブルトランスフェクトした場合、YK-ECは他の群に比べ強く反応して、IFN-γを産生した。このことから、HLA-A0201に腫瘍抗原タンパク質SART-1の抗原ペプチドが提示され、これをYK-ECが認識すること、すなわちSART-1にはHLA-A2拘束性の腫瘍抗原ペプチドの存在していることが明らかになった。

実施例3 腫瘍抗原ペプチドの選択と合成

20

HLA分子に結合して提示される抗原ペプチドの配列には規則性(モチーフ)のあることが知られており、HLA-A2の場合は、表3に示したモチーフが知られている(Immunogenetics, 41:178, 1995、J. Immunol., 155:4749-4756, 1995)。

表 3 HLA-A2拘束性抗原ペプチドのモチーフ

25

HLA-A2のタイプ	N末端から2番目のアミノ酸	C末端のアミノ酸
HLA-A0201	L, M	V, L
HLA-A0204	L	L
HLA-A0205	V, L, I, M	L
HLA-A0206	V, Q	V, L

HLA-A0207

L

L

(ペプチドの長さは8～11アミノ酸)

腫瘍抗原タンパク質SART-1のアミノ酸配列（国際公開第97/46676号パンフレットにおいて配列番号：1として記載されたアミノ酸配列）のうち上記モチーフを有する9～10アミノ酸よりなるペプチドを、配列番号：1～配列番号：34に示す。このうち、SART-1のアミノ酸配列上第642位～第650位を有するペプチドを「642-650」（配列番号：1）、第642位～第651位を有するペプチドを「642-651」（配列番号：2）、第650位～第658位を有するペプチドを「650-658」（配列番号：3）、第660位～第668位を有するペプチドを「660-668」（配列番号：4）、第712位～第720位を有するペプチドを「712-720」（配列番号：5）、第778位～第786位を有するペプチドを「778-786」（配列番号：6）と命名し、以下のように固相法により合成した。

[1] SART-1「642-650」Leu-Leu-Leu-Cys-Gln-Asn-Lys-Gly-Leu（配列番号：1）の合成

樹脂はFmoc-Leu-Alko Resin(0.57mmol/g、100-200mesh、(渡辺化学))を用いた。この樹脂100mgを用いて、後記スケジュール1に従って合成を開始し、Fmoc-Gly-OH、Fmoc-Lys(Boc)-OH、Fmoc-Asn-OH、Fmoc-Gln-OH、Fmoc-Cys(tBu)-OH、Fmoc-Leu-OH、Fmoc-Leu-OH、Fmoc-Leu-OHを順次カップリングさせた。カップリングの後、下記スケジュール1の工程3まで行い、その結果、ペプチド樹脂が得られた。

このペプチド樹脂にReagent K(5%フェノール、5%チオアニソール、5% H_2O 、2.5%エタンジチオール/TFA溶液)2mlを加え、室温で2.5時間反応させた。氷冷下反応液にジエチルエーテル10mlを加え10分攪拌し、濾過しジエチルエーテル10mlで洗浄した。濾上物に酢酸水10mlを加えて30分間攪拌後、樹脂を濾別し、酢酸水4mlで洗浄した。濾洗液を凍結乾燥後、得られた粗ペプチドを酢酸水に溶解し、予め0.1%TFA水で平衡化させた逆相系充填剤YMC-PACK ODS-Aカラム(30φ×250mm)に注入し、カラムを0.1%TFA水で洗浄後、アセトニトリル濃度を180分

で30%まで増加させ、流速7ml/min. で溶出した。溶出液をA220nmでモニターし、目的物を含む画分を集め、凍結乾燥し、Leu-Leu-Leu-Cys-Gln-Asn-Lys-Gly-Leu 46. 3mgを得た。

5 得られたペプチドは、逆相系充填剤SUMIPACK ODS-A211カラム(4. 6φ×250mm)を用いた、16%から46%までの0. 1%TFAを含むアセトニトリルの直線濃度勾配溶出法による分析において保持時間21. 0分を示し、そのアミノ酸分析値(ただし、Cysは検出せず) および質量分析値は理論値と一致した。

アミノ酸分析

10 加水分解: 1%フェノール/6N塩酸水溶液、110℃、24時間

分析法: ニンヒドリン法

Asx: 0. 9 (1)

Glx: 1. 0 (1)

Gly: 0. 9 (1)

15 *Leu: 4. 0 (4) *基準アミノ酸

Lys: 1. 0 (1)

() 内理論値

質量分析 (FAB) [M+H]⁺: 1001. 6

スケジュール1

20	工程	時間 (分) × 処理回数
	1. (洗浄) DMF 1. 2 ml	1 × 2
	2. (脱保護) 50%ピペリジン/DMF	12 × 1
	3. (洗浄) DMF 1. 2 ml	1 × 7
	4. (カップリング) 各アミノ基保護アミノ酸 (5当量)	
25	/NMP溶液0. 9 ml、DIC (5当量) /NMP	
	溶液0. 3 ml	30 × 1
	5. (洗浄) DMF 1. 2 ml	1 × 2
	6. (カップリング) 各アミノ基保護アミノ酸 (5当量)	
	/NMP溶液0. 9 ml、DIC (5当量) /NMP	

溶液 0. 3 ml

30 × 1

7. (洗浄) DMF 1. 2 ml

1 × 4

[2] SART-1「642-651」Leu-Leu-Leu-Cys-Gln-Asn5 n-Lys-Gly-Leu-Leu (配列番号: 2) の合成

樹脂はFmoc-Leu-Alko Resin (0. 57 mmol/g、100-200 mesh) を用いた。この樹脂100mgを用いて、前記[1]と同様にして、Fmoc-Leu-OH、Fmoc-Gly-OH、Fmoc-Lys(Boc)-OH、Fmoc-Asn-OH、Fmoc-Gln-OH、Fmoc-Cys(tBu)-OH、Fmoc-Leu-OH、Fmoc-Leu-OH、Fmoc-Leu-OH
10 を順次カップリングさせた。カップリングの後、前記スケジュール1の工程3まで行い、その結果、ペプチド樹脂が得られた。

このペプチド樹脂にReagent K (5%フェノール、5%チオアニソール、5% H_2O 、2. 5%エタンジチオール/TFA溶液) 2mlを加え、室温で2. 5時間反応させた。氷冷下反応液にジエチルエーテル10mlを加え10分攪拌し、濾過しジエチルエーテル10mlで洗浄した。濾上物に酢酸水10mlを加えて30分間攪拌後、樹脂を濾別し、酢酸水4mlで洗浄した。濾洗液を凍結乾燥後、得られた粗ペプチドを酢酸水に溶解し、予め0. 1%TFA水で平衡化させた逆相系充填剤YMC-PACK ODS-Aカラム (30φ×250mm)
15 に注入し、カラムを0. 1%TFA水で洗浄後、アセトニトリル濃度を120分で32%まで増加させ、流速7ml/min. で溶出した。溶出液をA220nmでモニターし、目的物を含む画分を集め、凍結乾燥し、Leu-Leu-Leu-Cys-Gln-Asn-Lys-Gly-Leu-Leu 27. 1mgを得た。

得られたペプチドは、逆相系充填剤SUMIPACK ODS-A211カラム (4. 6φ×250mm) を用いた、18%から48%までの0. 1%TFAを含むアセトニトリルの直線濃度勾配溶出法による分析において保持時間22. 8分を示し、そのアミノ酸分析値 (ただし、Cysは検出せず) および質量分析値は理論値と一致した。

アミノ酸分析

加水分解：1%フェノール／6N塩酸水溶液、110℃、24時間

分析法：ニンヒドリン法

Asx : 1.0 (1)

Glx : 1.0 (1)

5 Gly : 0.9 (1)

*Leu : 5.0 (5) *基準アミノ酸

Lys : 0.9 (1)

() 内理論値

質量分析 (FAB) [M+H]⁺ : 1114.6

10 [3] SART-1「650-658」Leu-Leu-Glu-Thr-Thr-Val-Gln-Lys-Val (配列番号：3) の合成

樹脂はFmoc-Val-Alko Resin (0.62 mmol/g、100-200 mesh) を用いた。この樹脂100mgを用いて、前記〔1〕と同様にして、Fmoc-Lys(Boc)-OH、Fmoc-Gln-OH、Fmoc-Val-OH、Fmoc-Thr(tBu)-OH、
15 Fmoc-Thr(tBu)-OH、Fmoc-Glu(OtBu)-OH、Fmoc-Leu-OH、Fmoc-Leu-OHを順次カップリングさせた。カップリングの後、前記スケジュール1の工程3まで行い、その結果、ペプチド樹脂が得られた。

このペプチド樹脂にReagent K (5%フェノール、5%チオアニソール、5% H₂O、2.5%エタンジチオール／TFA溶液) 2mlを加え、室温で2.
20 5時間反応させた。氷冷下反応液にジエチルエーテル10mlを加え10分攪拌し、濾過しジエチルエーテル10mlで洗浄した。濾上物に酢酸水10mlを加えて30分間攪拌後、樹脂を濾別し、酢酸水4mlで洗浄した。濾洗液を凍結乾燥後、得られた粗ペプチドを酢酸水に溶解し、予め0.1% TFA水で平衡化させた逆相系充填剤YMC-PACK ODS-Aカラム (30φ×250mm)
25 に注入し、カラムを0.1% TFA水で洗浄後、アセトニトリル濃度を180分で30%まで増加させ、流速7ml/min. で溶出した。溶出液をA220nmでモニターし、目的物を含む画分を集め、凍結乾燥し、Leu-Leu-Glu-Thr-Thr-Val-Gln-Lys-Val 32.2mgを得た。

得られたペプチドは、逆相系充填剤SUMIPACK ODS-A211カラ

ム (4.6 ϕ \times 250 mm) を用いた、11%から41%までの0.1% TFAを含むアセトニトリルの直線濃度勾配溶出法による分析において保持時間20.2分を示し、そのアミノ酸分析値および質量分析値は理論値と一致した。

アミノ酸分析

5 加水分解：1%フェノール／6N塩酸水溶液、110℃、24時間

分析法：ニンヒドリン法

Thr : 1.6 (2)

Glx : 1.9 (2)

Val : 1.8 (2)

10 *Leu : 2.0 (2) *基準アミノ酸

Lys : 0.9 (1)

() 内理論値

質量分析 (FAB) [M+H]⁺ : 1030.6

15 [4] SART-1「660-668」Arg-Val-Lys-Ala-Pro-Asn-Lys-Ser-Leu (配列番号：4) の合成

樹脂はFmoc-Leu-Alko Resin (0.57 mmol/g、100-200 mesh) を用いた。この樹脂100 mgを用いて、前記〔1〕と同様にして、Fmoc-Ser(tBu)-OH、Fmoc-Lys(Boc)-OH、Fmoc-Asn-OH、Fmoc-Pro-OH、Fmoc-Ala-OH、Fmoc-Lys(Boc)-OH、Fmoc-Val-OH、Fmoc-Arg(Pmc)-OH
20 を順次カップリングさせた。カップリングの後、前記スケジュール1の工程3まで行い、その結果、ペプチド樹脂が得られた。

25 このペプチド樹脂にReagent K (5%フェノール、5%チオアニソール、5% H₂O、2.5%エタンジチオール／TFA溶液) 2 mlを加え、室温で2.5時間反応させた。氷冷下反応液にジエチルエーテル10 mlを加え10分攪拌し、濾過しジエチルエーテル10 mlで洗浄した。濾上物に酢酸水10 mlを加えて30分間攪拌後、樹脂を濾別し、酢酸水4 mlで洗浄した。濾洗液を凍結乾燥後、得られた粗ペプチドを酢酸水に溶解し、予め0.1% TFA水で平衡化させた逆相系充填剤YMC-PACK ODS-Aカラム (30 ϕ \times 250 mm) に注入し、カラムを0.1% TFA水で洗浄後、アセトニトリル濃度を180分

で20%まで増加させ、流速7ml/min. で溶出した。溶出液をA220nmでモニターし、目的物を含む画分を集め、凍結乾燥し、Arg-Val-Lys-Ala-Pro-Asn-Lys-Ser-Leu 44.7mgを得た。

- 5 得られたペプチドは、逆相系充填剤SUMIPACK ODS-A211カラム(4.6φ×250mm)を用いた、6%から36%までの0.1%TFAを含むアセトニトリルの直線濃度勾配溶出法による分析において保持時間20.2分を示し、そのアミノ酸分析値および質量分析値は理論値と一致した。

アミノ酸分析

加水分解：1%フェノール/6N塩酸水溶液、110℃、24時間

- 10 分析法：ニンヒドリン法

Asx : 0.9 (1)

Ser : 0.7 (1)

Ala : 0.9 (1)

Val : 0.9 (1)

- 15 *Leu : 1.0 (1) *基準アミノ酸

Lys : 1.7 (2)

Arg : 0.8 (1)

Pro : 0.9 (1)

() 内理論値

- 20 質量分析 (FAB) [M+H]⁺ : 1012.6

[5] SART-1「712-720」Tyr-Val-Asp-Glu-Thr-Gly-Arg-Lys-Leu (配列番号：5) の合成

- 25 樹脂はFmoc-Leu-Alko Resin (0.57mmol/g、100-200mesh)を用いた。この樹脂100mgを用いて、前記[1]と同様にして、Fmoc-Lys(Boc)-OH、Fmoc-Arg(Pmc)-OH、Fmoc-Gly-OH、Fmoc-Thr(tBu)-OH、Fmoc-Glu(OtBu)-OH、Fmoc-Asp(OtBu)-OH、Fmoc-Val-OH、Fmoc-Tyr(tBu)-OHを順次カップリングさせた。カップリングの後、前記スケジュール1の工程3まで行い、その結果、ペプチド樹脂が得られた。

このペプチド樹脂にReagent K (5%フェノール、5%チオアニソール、

5 5% H_2O 、2. 5%エタンジチオール/TFA溶液) 2 mlを加え、室温で2. 5時間反応させた。氷冷下反応液にジエチルエーテル10 mlを加え10分攪拌し、濾過しジエチルエーテル10 mlで洗浄した。濾上物に酢酸水10 mlを加えて30分間攪拌後、樹脂を濾別し、酢酸水4 mlで洗浄した。濾洗液を凍結乾燥後、得られた粗ペプチドを酢酸水に溶解し、予め0. 1%TFA水で平衡化させた逆相系充填剤YMC-PACK ODS-Aカラム(30 ϕ ×250 mm)に注入し、カラムを0. 1%TFA水で洗浄後、アセトニトリル濃度を120分で20%まで増加させ、流速7 ml/min. で溶出した。溶出液をA220 nmでモニターし、目的物を含む画分を集め、凍結乾燥し、Tyr-Val-Asp-Glu-Thr-Gly-Arg-Lys-Leu 42. 3 mgを得た。

10 得られたペプチドは、逆相系充填剤SUMIPACK ODS-A211カラム(4. 6 ϕ ×250 mm)を用いた、7%から37%までの0. 1%TFAを含むアセトニトリルの直線濃度勾配溶出法による分析において保持時間20. 9分を示し、そのアミノ酸分析値および質量分析値は理論値と一致した。

15 アミノ酸分析

加水分解：1%フェノール/6N塩酸水溶液、110°C、24時間

分析法：ニンヒドリン法

20 Asx : 0. 9 (1)
Thr : 0. 9 (1)
Glx : 1. 0 (1)
Gly : 0. 9 (1)
Val : 0. 9 (1)
*Leu : 1. 0 (1) *基準アミノ酸
Tyr : 1. 0 (1)
25 Lys : 0. 9 (1)
Arg : 0. 9 (1)

() 内理論値

質量分析 (FAB) [M+H]⁺ : 1080. 5

[6] SART-1「778-786」Ala-Gln-Lys-Thr-Pro-Ty

r-Ile-Val-Leu (配列番号: 6) の合成

樹脂はFmoc-Leu-Alko Resin (0.57 mmol/g、100-200 mesh) を用いた。この樹脂100mgを用いて前記〔1〕と同様にして、Fmoc-Val-OH、Fmoc-Ile-OH、Fmoc-Tyr (tBu) -OH、Fmoc-Pro-OH、Fmoc-Thr (tBu) -OH、Fmoc-Lys (Boc) -OH、Fmoc-Gln-OH、Fmoc-Ala-OHを順次カップリングさせた。カップリングの後、前記スケジュール1の工程3まで行い、その結果、ペプチド樹脂が得られた。

このペプチド樹脂にReagent K (5%フェノール、5%チオアニソール、5% H_2O 、2.5%エタンジチオール/TFA溶液) 2mlを加え、室温で2.5時間反応させた。氷冷下反応液にジエチルエーテル10mlを加え10分攪拌し、濾過しジエチルエーテル10mlで洗浄した。濾上物に酢酸水10mlを加えて3.0分間攪拌後、樹脂を濾別し、酢酸水4mlで洗浄した。濾洗液を凍結乾燥後、得られた粗ペプチドを酢酸水に溶解し、予め0.1%TFA水で平衡化させた逆相系充填剤YMC-PACK ODS-Aカラム (30φ×250mm) に注入し、カラムを0.1%TFA水で洗浄後、アセトニトリル濃度を120分で30%まで増加させ、流速7ml/min. で溶出した。溶出液をA220nmでモニターし、目的物を含む画分を集め、凍結乾燥し、Ala-Gln-Lys-Thr-Pro-Tyr-Ile-Val-Leu 29.3mgを得た。

得られたペプチドは、逆相系充填剤SUMIPACK ODS-A211カラム (4.6φ×250mm) を用いた、15%から45%までの0.1%TFAを含むアセトニトリルの直線濃度勾配溶出法による分析において保持時間22.6分を示し、そのアミノ酸分析値および質量分析値は理論値と一致した。

アミノ酸分析

加水分解: 1%フェノール/6N塩酸水溶液、110°C、24時間

分析法: ニンヒドリン法

Thr: 0.8 (1)

Glx: 1.0 (1)

Ala: 1.1 (1)

Val: 0.8 (1)

I l e : 0 . 8 (1)
 * L e u : 1 . 0 (1) * 基準アミノ酸
 T y r : 0 . 9 (1)
 L y s : 0 . 9 (1)
 5 P r o : 0 . 9 (1)

() 内理論値

質量分析 (F A B) [M + H] ⁺ : 1 0 3 2 . 5

実施例 4 腫瘍抗原ペプチドの同定

10 HLA-A0201陽性であるが内因性ペプチド提示能が欠損しているT-Bハイブリド
 ーマ細胞株のT2細胞 (Immunogenetics, 21:235, 1985) 2×10⁴個に対して実施例
 3 で作製した6種類のペプチドをそれぞれ10 μ Mで2時間添加した後、1×10⁵個の
 YK-ECとともに18時間培養し、YK-ECが産生した培養上清中のIFN-γ量を、実施例
 2 と同様のELISA法にて測定した。その結果を表4に示す。

15 表 4 YK-ECが産生したIFN-γ量

	パルスしたペプチド	YK-ECが産生したIFN-γ量 (pg/ml)
	「642-650」	1 0 9 . 1
	「642-651」	1 1 2 . 4
	「650-658」	1 1 8 . 1
20	「660-668」	7 1 . 1
	「712-720」	8 6 . 1
	「778-786」	1 0 5 . 4
	ペプチドなし	6 . 5

25 表4より、これらのペプチドが腫瘍抗原ペプチドとして機能することが示され
 た。

なお本実験で用いたT2細胞の代わりに、HLA-A2 cDNA発現プラスミドをCOS-7細胞
 (ATCC No. CRL1651) やVA-13細胞 (理化学研究所細胞銀行) に導入した細胞を
 用いることによっても、同様の実験を行うことが可能である。

(J. Exp. Med., 187:277, 1998)。

さらに、Fmoc法にて合成した配列番号：7～配列番号：20に記載のペプチドを前記と同様の腫瘍抗原ペプチドの同定法に供した結果、これら配列番号：7～配列番号：20に記載のペプチドについても腫瘍抗原ペプチドとしての活性を有していることが明らかとなった。

産業条の利用可能性

本発明により、SART-1由来のHLA-A2拘束性腫瘍抗原ペプチドおよび機能的に同等の特性を有するその誘導体、またはこれらの腫瘍抗原ペプチドおよびその誘導体をイン・ビボまたはイン・ビトロで利用した腫瘍の治療剤、予防剤または診断薬などが提供される。本発明の腫瘍の治療剤または予防剤は、多くの患者に適用可能であり、さらに、発生頻度の高い扁平上皮癌等に幅広く応用できるものであるため、抗腫瘍剤としての有用性が期待される。

配列表フリーテキスト

配列番号：35に記載のアミノ酸配列の第2番目のアミノ酸は、ロイシン、メチオニン、バリン、イソロイシンまたはグルタミンであり、第9番目のアミノ酸は、バリンまたはロイシンである。

配列番号：36に記載のアミノ酸配列の第2番目のアミノ酸は、ロイシン、メチオニン、バリン、イソロイシンまたはグルタミンであり、第10番目のアミノ酸は、バリンまたはロイシンである。

配列番号：37に記載のアミノ酸配列の第2番目のアミノ酸は、ロイシン、メチオニン、バリン、イソロイシンまたはグルタミンであり、第9番目のアミノ酸は、バリンまたはロイシンである。

配列番号：38に記載のアミノ酸配列の第2番目のアミノ酸は、ロイシン、メチオニン、バリン、イソロイシンまたはグルタミンであり、第9番目のアミノ酸は、バリンまたはロイシンである。

配列番号：39に記載のアミノ酸配列の第2番目のアミノ酸は、ロイシン、メチオニン、バリン、イソロイシンまたはグルタミンであり、第9番目のアミノ酸は、バリンまたはロイシンである。

配列番号：40に記載のアミノ酸配列の第2番目のアミノ酸は、ロイシン、メチオニン、バリン、イソロイシンまたはグルタミンであり、第9番目のアミノ酸は、バリンまたはロイシンである。

請 求 の 範 囲

1. SART-1由来の部分ペプチドであって、かつHLA-A2抗原と結合して細胞傷害性T細胞により認識され得る腫瘍抗原ペプチド、または機能的に同等の特性を有するその誘導体。
5
2. 配列番号：1～配列番号：34のいずれかに記載のアミノ酸配列の全部または一部を含む配列より選択される、請求項1記載の腫瘍抗原ペプチド、または機能的に同等の特性を有するその誘導体。
- 10 3. 配列番号：1～配列番号：6のいずれかに記載のアミノ酸配列の全部または一部を含む配列より選択される、請求項2記載の腫瘍抗原ペプチド、または機能的に同等の特性を有するその誘導体。
4. 配列番号：1～配列番号：34のいずれかに記載のアミノ酸配列の第2位および/またはC末端のアミノ酸残基が他のアミノ酸残基に置換されたアミノ酸配列の全部または一部を含む配列より選択される、請求項2記載の腫瘍抗原ペプチド誘導体。
15
5. 配列番号：1～配列番号：6のいずれかに記載のアミノ酸配列の第2位および/またはC末端のアミノ酸残基が他のアミノ酸残基に置換されたアミノ酸配列の全部または一部を含む配列より選択される、請求項4記載の腫瘍抗原ペプチド誘導体。
20
6. 配列番号：1～配列番号：34のいずれかに記載のアミノ酸配列の第2位がロイシン、メチオニン、バリン、イソロイシンまたはグルタミンに置換され、および/またはC末端のアミノ酸残基がバリンまたはロイシンに置換されたアミノ酸配列の全部または一部を含む配列より選択される、請求項4記載の腫瘍抗原ペプチド誘導体。
25
7. 配列番号：35～配列番号：40のいずれかに記載のアミノ酸配列の全部または一部を含む配列より選択される、請求項6記載の腫瘍抗原ペプチド誘導体。
8. 請求項1～7のいずれか記載の腫瘍抗原ペプチドおよびその誘導体から選択される少なくとも1種を有効成分として含有してなる、腫瘍の治療剤または予防

剤。

9. 請求項1～7のいずれかに記載の腫瘍抗原ペプチドまたはその誘導体をコードするDNAの少なくとも1種を含有する組換えDNA。

10. 請求項9記載の組換えDNAを発現させて得られうるポリペプチド。

5 11. 請求項9記載の組換えDNAまたは請求項10記載のポリペプチドを有効成分として含有してなる、腫瘍の治療剤または予防剤。

12. 請求項1～7のいずれかに記載の腫瘍抗原ペプチドもしくはその誘導体または請求項10記載のポリペプチドを含有してなる腫瘍の診断薬。

10 13. 請求項1～7のいずれか記載の腫瘍抗原ペプチドまたはその誘導体に特異的に結合する抗体。

14. 腫瘍患者由来の単離された抗原提示能を有する細胞の表面に、HLA-A2抗原と請求項1～7のいずれかに記載の腫瘍抗原ペプチドまたはその誘導体との複合体を提示させてなる抗原提示細胞。

15 15. 請求項9記載の組換えDNAまたは請求項10記載のポリペプチドを、腫瘍患者由来の単離された抗原提示能を有する細胞に取り込ませて得られうる、請求項14記載の抗原提示細胞。

16. 請求項14または15記載の抗原提示細胞を有効成分として含有してなる腫瘍の治療剤。

20 17. HLA-A2抗原と請求項1～7のいずれかに記載の腫瘍抗原ペプチドまたはその誘導体との複合体を特異的に認識する細胞傷害性T細胞。

18. 請求項17記載の細胞傷害性T細胞を有効成分として含有してなる腫瘍の治療剤。

19. 受託番号がFERM BP-6726である、請求項17記載の細胞傷害性T細胞YK-EC。

25 20. 請求項19記載のYK-ECを用いることを特徴とする、腫瘍抗原タンパク質または腫瘍抗原ペプチドの同定方法。

1/1

PCT

原本（出願用） - 印刷日時 1999年07月26日（26.07.1999）月曜日 16時07分33秒

0-1	寄託された微生物又はその他の生物材料に関する表示 (PCT規則13の2)(様式 - PCT/RO/134(EASY))は、 右記によって作成された。	PCT-EASY Version 2.84 (updated 01.07.1999)
0-2	国際出願番号	
0-3	出願人又は代理人の書類記号	661431
1	下記の表示は発明の詳細な説明中に記載された微生物又は生物材料に関連している。	
1-1	記載頁	18
1-2	行	29
1-3	寄託の表示	
1-3-1	寄託機関の名称	通商産業省・工業技術院生命工学技術研究所(NIBH)
1-3-2	寄託機関のあて名	日本国 〒305-8566 茨城県つくば市東1丁目1-3
1-3-3	寄託の日付	1999年05月20日 (20.05.1999)
1-3-4	受託番号	NIBH FERM BP-6726
1-4	追加の表示	寄託微生物は申請者指定専門家にのみ分譲されることを要求する
1-5	この表示を行うための指定国	EP: (AT BE CH&LI CY DE DK ES FI FR GB GR IE IT LU MC NL PT SE); AT CH&LI DE DK ES FI GB LU PT SE
1-6	追加事項の表示の届け出 右記の表示は後に国際事務局に届け出る予定である。	なし (NONE)
受理官庁記入欄		
0-4	この用紙は国際出願とともに受理した (はい/いいえ)	✓
0-4-1	権限のある職員	森。優
国際事務局記入欄		
0-5	この用紙が国際事務局に受理された日	06 AUG 1999
0-5-1	権限のある職員	窪 進

SEQUENCE LISTING

<110> ITOH, Kyogo; Sumitomo Pharmaceuticals Co.,Ltd.

<120> HLA-A2-restricted Tumor Antigen Peptides Derived From SART-1

5

<130> 661431

<150> JP H10-212940

<151> 1998-7-28

10

<160> 40

<210> 1

<211> 9

15

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 1

Leu Leu Leu Cys Gln Asn Lys Gly Leu

20

5

<210> 2

<211> 10

<212> PRT

<213> Homo sapiens

25

<400> 2

Leu Leu Leu Cys Gln Asn Lys Gly Leu Leu

5

10

2,

<210> 3

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

5

<400> 3

Leu Leu Glu Thr Thr Val Gln Lys Val

5

10

<210> 4

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

15

<400> 4

Arg Val Lys Ala Pro Asn Lys Ser Leu

5

20

<210> 5

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

25

<400> 5

Tyr Val Asp Glu Thr Gly Arg Lys Leu

5

<210> 6

<211> 9

3,

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 6

5 Ala Gln Lys Thr Pro Tyr Ile Val Leu

5

<210> 7

<211> 9

10 <212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 7

15 Ile Leu Thr Leu Lys Asp Lys Gly Val

5

<210> 8

<211> 9

<212> PRT

20 <213> Homo sapiens

<400> 8

Val Leu Gln Glu Glu Glu Asp Val Leu

5

25

<210> 9

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

4.

<400> 9

Leu Gln Glu Glu Glu Asp Val Leu Val

5

5

<210> 10

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

10

<400> 10

Ile Leu Ser Lys Tyr Asp Glu Glu Leu

5

15

<210> 11

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

20

<400> 11

Glu Gln Gly Gly Thr Ala Asp Gly Leu

5

<210> 12

<211> 9

25

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 12

Lys Leu Arg Leu Gln Ala Gln Ser Leu

5,

5

<210> 13

<211> 9

5 <212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 13

Leu Gln Ala Gln Ser Leu Ser Thr Val

10

5

<210> 14

<211> 9

<212> PRT

15 <213> Homo sapiens

<400> 14

Ser Leu Ser Thr Val Gly Pro Arg Leu

5

20

<210> 15

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

25

<400> 15

Val Val Val Arg Ala Asp Asp Leu Leu

5

6

<210> 16

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

5

<400> 16

Pro Leu Pro Ser Asp Asp Thr Arg Val

5

10

<210> 17

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

15

<400> 17

Val Leu Glu Glu Asp Glu Ala Glu Leu

5

20

<210> 18

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

25

<400> 18

Lys Gln Leu Glu Lys Gly Arg Arg Leu

5

<210> 19

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 19

5 Arg Gln Leu Gln Gln Leu Gln Gln Leu

5

<210> 20

<211> 9

10 <212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 20

Gln Leu Arg Asp Ser Gly Glu Lys Val

15 5

<210> 21

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

20

<400> 21

Lys Leu Gly Leu Lys Pro Leu Glu Val

5

25 <210> 22

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

8.

<400> 22

Thr Leu Gly Glu Asp Asp Pro Trp Leu

5

5 <210> 23

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

10 <400> 23

Arg Gln Leu Gln Lys Glu Lys Asp Leu

5

<210> 24

15 <211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 24

20 Asp Leu Ala Glu Lys Arg Ala Lys Leu

5

<210> 25

<211> 9

25 <212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 25

Asp Gln Glu Phe Gly Val Ser Thr Leu

9

5

<210> 26

<211> 9

5 <212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 26

Gly Val Leu Gln Glu Glu Glu Asp Val

10

5

<210> 27

<211> 9

<212> PRT

15 <213> Homo sapiens

<400> 27

Asp Val Leu Val Asn Val Asn Leu Val

5

20

<210> 28

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

25

<400> 28

Ala Gln Gln Lys Pro Arg Ser Ile Leu

5

10

<210> 29

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

5

<400> 29

Glu Leu Glu Glu Ile Arg Ala Lys Leu

5

10

<210> 30

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

15

<400> 30

Glu Val Val Val Arg Ala Asp Asp Leu

5

<210> 31

20

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 31

25

Glu Val Glu Glu Glu Lys Glu Pro Val

5

<210> 32

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 32

5 Lys Val Val Glu Ile Val Lys Lys Leu

5

<210> 33

<211> 9

10 <212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 33

Asn Ile Gly Trp Ser Thr Val Asn Leu

15

5

<210> 34

<211> 9

<212> PRT

20 <213> Homo sapiens

<400> 34

Lys Met Ser Ser Ser Asp Thr Pro Leu

5

25

<210> 35

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

12

<220>

<221> VARIANT

<222> 2

<223> Xaa is Leu, Met, Val, Ile or Gln.

5 <220>

<221> VARIANT

<222> 9

<223> Xaa is Val or Leu.

10 <400> 35

Leu Xaa Leu Cys Gln Asn Lys Gly Xaa

5

<210> 36

15 <211> 10

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<221> VARIANT

20 <222> 2

<223> Xaa is Leu, Met, Val, Ile or Gln.

<220>

<221> VARIANT

<222> 10

25 <223> Xaa is Val or Leu.

<400> 36

Leu Xaa Leu Cys Gln Asn Lys Gly Leu Xaa

5

10

13,

<210> 37
<211> 9
<212> PRT
5 <213> Artificial Sequence
<220>
<221> VARIANT
<222> 2
<223> Xaa is Leu, Met, Val, Ile or Gln.
10 <220>
<221> VARIANT
<222> 9
<223> Xaa is Val or Leu.

15 <400> 37
Leu Xaa Glu Thr Thr Val Gln Lys Xaa
5

<210> 38
20 <211> 9
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220>
<221> VARIANT
25 <222> 2
<223> Xaa is Leu, Met, Val, Ile or Gln.
<220>
<221> VARIANT
<222> 9

14,

<223> Xaa is Val or Leu.

<400> 38

Arg Xaa Lys Ala Pro Asn Lys Ser Xaa

5

5

<210> 39

<211> 9

<212> PRT

10 <213> Artificial Sequence

<220>

<221> VARIANT

<222> 2

<223> Xaa is Leu, Met, Val, Ile or Gln.

15 <220>

<221> VARIANT

<222> 9

<223> Xaa is Val or Leu.

20 <400> 39

Tyr Xaa Asp Glu Thr Gly Arg Lys Xaa

5

<210> 40

25 <211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<221> VARIANT

<222> 2

<223> Xaa is Leu, Met, Val, Ile or Gln.

<220>

<221> VARIANT

5 <222> 9

<223> Xaa is Val or Leu.

<400> 40

Ala Xaa Lys Thr Pro Tyr Ile Val Xaa

10

5

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP99/04010

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
Int.Cl.⁶ C07K7/06, A61K38/08, C12N15/12, C07K16/18, C12N5/10, A61K35/14
// C12P21/02

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int.Cl.⁶ C07K7/06, A61K38/08, C12N15/12, C07K16/18, C12N5/10, A61K35/14, C12P21/02

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

CA (STN), REGISTRY (STN), WPI (DIALOG), BIOSIS (DIALOG), JICST (JOIS)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO, 97/46676, A1 (Kyogo Itoh), 11 December, 1997 (11. 12. 97) & AU, 9730479, A & EP, 911397, A1	1-20
X	SHICHIJO, S. et al., "A gene encoding antigenic peptides of human squamous cell carcinoma recognized by cytotoxic Tlymphocyte", J. Exp. Med. (1998. Feb.) Vol. 187, No. 3, p.277-288	1-20
Y	NAKAO, M. et al., "HLA A2601-restricted CTLs recognize a peptide antigen expressed on squamous cell carcinoma", Cancer Res. (1995) Vol. 55, No. 19, p.4248-4252	1-20
Y	RIVOLTINI, L. et al., "Induction of tumor-reactive CTL from peripheral blood and tumor-infiltrating lymphocytes of melanoma patients by in vitro stimulation with an immunodominant peptide of the human melanoma antigen MART-1", J. Immunol. (1995) Vol. 154, No. 5, p.2257-2265	1-20

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C. ☐ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:	"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance	"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
"E" earlier document but published on or after the international filing date	"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)	"&" document member of the same patent family
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means	
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed	

Date of the actual completion of the international search
5 October, 1999 (05. 10. 99)

Date of mailing of the international search report
12 October, 1999 (12. 10. 99)

Name and mailing address of the ISA/
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP99/04010

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	RAMMENSEE, H.G. et al., "MHC ligands and peptide motifs: first listing", Immunogenetics (1995) Vol. 41, No. 4, p.178-228	1-20
Y	SUDO, T. et al., "Differences in MHC class I self peptide repertoires among HLA-A2 subtype", J. Immunol. (1995) Vol. 155, No. 10, p.4749-4756	1-20
P, X	WO, 99/29715, A1 (Kyogo Itoh), 17 June, 1999 (17. 06. 99)	1-20
P, X	KIKUCHI, M. et al., "Identification of a SART-1-derived peptide capable of inducing HLA-A24-restricted and tumor-specific cytotoxic T lymphocytes", Int. J. Cancer (1999. May.) Vol. 81, No. 3, p.459-466	1-20

国際調査報告

国際出願番号 PCT/J P 99/04010

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl⁸ C07K 7/06, A61K 38/08, C12N 15/12, C07K 16/18, C12N 5/10, A61K 35/14 // C12P 21/02

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl⁸ C07K 7/06, A61K 38/08, C12N 15/12, C07K 16/18, C12N 5/10, A61K 35/14, C12P 21/02

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

CA(STN), REGISTRY(STN), WPI(DIALOG), BIOSIS(DIALOG), JICST(JOIS)

C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
X	WO, 97/46676, A1 (伊東 恭悟) 11. 12月. 1997(11. 12. 97) & AU, 9730479, A & EP, 911397, A1	1-20
X	SHICHIJO, S. et al. "A gene encoding antigenic peptides of human squamous cell carcinoma recognized by cytotoxic T lymphocyte", J. Exp. Med. (1998. Feb.) Vol. 187, No. 3, p. 277-288	1-20
Y	NAKAO, M. et al. "HLA A2601-restricted CTLs recognize a peptide antigen expressed on squamous cell carcinoma", Cancer Res. (1995) Vol. 55, No. 19, p. 4248-4252	1-20

☒ C欄の続きにも文献が列挙されている。☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文献のカテゴリー

- 「A」特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの
「E」国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの
「L」優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)
「O」口頭による開示、使用、展示等に言及する文献
「P」国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

- の日の後に公表された文献
「T」国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの
「X」特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの
「Y」特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの
「&」同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

05. 10. 99

国際調査報告の発送日

12.10.99

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/J P)

郵便番号 100-8915

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

高堀 栄二



4 B

9281

電話番号 03-3581-1101 内線 3448

C (続き) . 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
Y	RIVOLTINI, L. et al. "Induction of tumor-reactive CTL from peripheral blood and tumor-infiltrating lymphocytes of melanoma patients by in vitro stimulation with an immunodominant peptide of the human melanoma antigen MART-1", J. Immunol. (1995) Vol. 154, No. 5, p. 2257-2265	1-20
Y	RAMMENSEE, H. G. et al. "MHC ligands and peptide motifs: first listing", Immunogenetics (1995) Vol. 41, No. 4, p. 178-228	1-20
Y	SUDO, T. et al. "Differences in MHC class I self peptide repertoires among HLA-A2 subtype", J. Immunol. (1995) Vol. 155, No. 10, p. 4749-4756	1-20
P, X	WO, 99/29715, A1 (伊東 恭悟) 17.6月.1999(17.06.99)	1-20
P, X	KIKUCHI, M. et al. "Identification of a SART-1-derived peptide capable of inducing HLA-A24-restricted and tumor-specific cytotoxic T lymphocytes", Int. J. Cancer (1999. May.) Vol. 81, No. 3, p. 459-466	1-20